



(19) RU (11) 2 180 917 (13) C1  
(51) МПК<sup>7</sup> C 12 N 1/21, A 61 K 39/07, C  
12 N 1/20//(C 12 N 1/21, C 12 R  
1:07)

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2001113312/13, 21.05.2001  
(24) Дата начала действия патента: 21.05.2001  
(46) Дата публикации: 27.03.2002  
(56) Ссылки: 1. ЕР 0537342 A1, 21.04.1993. 2. WO 9703185, 30.01.1997.  
(98) Адрес для переписки:  
410005, г.Саратов, Университетская, 46,  
РосНИПЧИ "Микроб"

(71) Заявитель:  
Федеральное государственное учреждение  
Российский научно-исследовательский  
противочумный институт "Микроб"  
(72) Изобретатель: Микшик Н.И.,  
Попов Ю.А., Дроздов И.Г., Кутырев В.В.  
(73) Патентообладатель:  
Федеральное государственное учреждение  
Российский научно-исследовательский  
противочумный институт "Микроб"

(54) ШТАММ BACILLUS ANTHRACIS KM90 - ОСНОВА ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНСТРУИРОВАНИЯ  
ПРОДУЦЕНТОВ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ АНТИГЕНОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в микробиологии, иммунологии и ветеринарии. В результате направленного генетического конструирования, включающего отбор в популяции вакцинного штамма *B. anthracis* Sterne 34F2 спонтанного мутанта с пониженной протеолитической активностью, температурную элиминацию плазмиды pX01, инсерционный (Tp 917) мутагенез и отбор аспорогенного мутанта, получают стабильный штамм *B. anthracis* KM-90, сохраняющий свои

свойства при хранении, культивировании на питательных средах и при пассажах через организм лабораторных животных. Основные свойства штамма - аспорогенность, авирulentность, низкая активность протеолитических ферментов, способность к синтезу белков S-слоя - обеспечивают возможность его применения в качестве основы для конструирования продуцентов сибираязвенных антигенов и других биологически активных веществ, входящих в состав сибираязвенных вакцин и диагностических препаратов.

R U 2 1 8 0 9 1 7 C 1

C 1 8 0 9 1 7 C 1



(19) RU (11) 2 180 917 (13) C1

(51) Int. Cl. 7

C 12 N 1/21, A 61 K 39/07, C

12 N 1/20//(C 12 N 1/21, C 12 R

1:07)

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2001113312/13, 21.05.2001

(24) Effective date for property rights: 21.05.2001

(46) Date of publication: 27.03.2002

(98) Mail address:  
410005, g.Saratov, Universitetskaja, 46,  
RosNIPChI "Mikrob"

(71) Applicant:

Federal'noe gosudarstvennoe uchrezhdenie  
Rossijskij nauchno-issledovatel'skij  
protivochumnyj institut "Mikrob"

(72) Inventor: Mikshis N.I.,

Popov Ju.A., Drozdov I.G., Kutyrev V.V.

(73) Proprietor:

Federal'noe gosudarstvennoe uchrezhdenie  
Rossijskij nauchno-issledovatel'skij  
protivochumnyj institut "Mikrob"

(54) STRAIN BACILLUS ANTHRACIS KM-90 AS BASE FOR GENETIC CONSTRUCTION OF PRODUCERS OF ANTHRAX ANTIGENS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, microbiology, immunology, veterinary science. SUBSTANCE: invention relates to preparing the stable strain *B. anthracis* KM-90 retaining properties at storage, culturing in nutrient media and passages through laboratory animal bodies. The strain is obtained after the directed genetic construction including selection in population of vaccine strain *B. anthracis* Sterne 34F2 of spontaneous mutant with decreased proteolytic activity, temperature elimination of plasmid pX01,

insertion (Tn 917) mutagenesis and selection of asporogenous mutant. The main properties of the strain are the following: asporogenicity, avirulence, low activity of proteolytic enzymes, ability to synthesize proteins of S-layer that provides the possibility of its use as the base for construction of producers of anthrax antigens and other biologically active substances that are components of anthrax vaccines and diagnostic preparations. EFFECT: strain indicated above, valuable properties.

R U  
2 1 8 0 9 1 7  
C 1

R U  
2 1 8 0 9 1 7  
C 1

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в микробиологии, генетике, конструировании продуцентов сибириязвенных антигенов и других биологически активных веществ, входящих в состав химических сибириязвенных вакцин и диагностических препаратов.

Известны примеры конструирования штаммов, синтезирующих сибириязвенные антигены, на основе бесплазмидных штаммов *Bacillus anthracis*. Так Barnard J. и Friedlander A. использовали в качестве основы для конструирования продуцентов протективного антигена (основного антигена, входящего в состав сибириязвенных вакцин) бесплазмидные штаммы *B. anthracis* DeltaANR и *B. anthracis* DeltaSterne (Barnard J., Friedlander A.//Infect. Immun. - 1999, - V. 67. - P. 562 - 567).

Известны примеры конструирования штаммов-продуцентов сибириязвенного протективного антигена на основе гетерогенного бесплазмидного штамма *Bacillus subtilis* WB600 (Baillie L., Moir A, Manchee R.//J. Appl. Microbiol. 1998. - V. 84. - P.741 - 746, Miller J., McBride B, Manchee R, Moore P., Baillie L. //Lett. Appl. Microbiol. -1998. - V. 26. - P.56 - 60). Особенностью штамма *B. subtilis* WB600 является низкая активность протеолитических ферментов, разрушающих протективный антиген на этапах выделения и очистки.

Однако перечисленные выше штаммы - основы для генетического конструирования, как и все представители рода *Bacillus*, являются спорообразующими. Способность сибириязвенного микробы к образованию спор при культивировании в лабораторных или промышленных условиях требует соблюдения строгих правил безопасности работы, пренебрежение которыми может привести к обсеменению помещения и оборудования спорами *B. anthracis* - возбудителя опасного инфекционного заболевания, сибирской язвы. Споры - основная форма сохранения *B. anthracis* в объектах внешней среды. В воде они сохраняются до 18 лет, в почве - до 300 лет и более. При температуре 120-140°C споры погибают только через 2-3 часа. Обычные обеззараживающие средства, принятые для работы с не образующими спор видами, на них не действуют. При попадании в благоприятные условия споры прорастают и образуют полноценные вегетативные клетки. Следовательно, использование в качестве основы для генетического конструирования продуцентов биологически активных веществ, в том числе сибириязвенных антигенов, штамма *B. anthracis* не способного к образованию спор (аспорогенного) более целесообразно.

Известен пример клонирования гена сибириязвенного протективного антигена в аспорогенном бесплазмидном штамме *B. anthracis* (Farchaus J., Ribot W., Jendrek S., Little S.//Appl. Environ. Microbiol. - 1998, - V. 64. -P.982 - 991).

Однако данный аспорогенный штамм обладает высокой активностью протеолитических ферментов, разрушающих синтезируемые белковые антигены. Активность протеолитических ферментов, приводящая к частичной потере выделяемого белка, является серьезной проблемой получения и очистки белковых препаратов. Для купирования разрушающего действия

протеолитических ферментов на белковый препарат необходимо использование ингибиторов протеаз и специальных сред выращивания, что усложняет и удорожает процесс выделения.

Задачей изобретения является получение стабильного аспорогенного штамма *B. anthracis* с низкой активностью протеолитических ферментов для использования в качестве основы при конструировании продуцентов различных сибириязвенных антигенов (антигенов клеточной стенки, протективного антигена, отечного и летального факторов, белков S-слоя) и других биологически активных веществ.

Сущность изобретения заключается в получении стабильного аспорогенного штамма-основы для конструирования продуцентов сибириязвенных антигенов и других биологически активных веществ.

Заявляемый штамм *B. anthracis* KM90 получен в результате направленного генетического конструирования, включающего несколько последовательных этапов: 1) отбор в популяции вакцинного штамма *B. anthracis* Sterne 34F2 спонтанного мутанта со сниженной протеолитической активностью, 2) температурная элиминация pXO1, 3) инсерционный (Tn 917) мутагенез, 4) отбор инсерционного аспорогенного мутанта.

Штамм депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий "Микроб" (Саратов) под номером KM90.

Основные свойства штамма *B. anthracis* KM90:

- аспорогенность - аспорогенность штамма дает преимущество при дальнейшем использовании сконструированных на его основе продуцентов сибириязвенных антигенов и других биологически активных веществ, так как отсутствует вероятность обсеменения рабочих помещений, лабораторного и промышленного оборудования спорами возбудителя сибирской язвы. Аспорогенность штамма обусловлена инсерцией транспозона (Tn 917);

- авирулентность - не содержит плазмид возбудителя сибирской язвы, где располагаются структурные и регуляторные гены синтеза двух основных факторов патогенности *B. anthracis* - токсина и капсулы;

- низкая активность протеолитических ферментов, разрушающих белковые препараты на этапах их выделения и очистки, что обеспечивает оптимальный выход белковых сибириязвенных антигенов и исключает необходимость применения ингибиторов протеаз;

- синтез белков S-слоя - заявляемый штамм в отличие от производственных вакцинных штаммов *B. anthracis* СТИ1 и *B. anthracis* 55 содержит в поверхностной клеточной структуре S-слой, играющий исключительную роль во взаимодействии с окружающей средой и обладающий антигенными свойствами;

- наличие резистентности к антибиотикам (эритромицину и линкамицину), обусловленной присутствием в составе генома транспозона Tn 917 (заявляемый штамм - транспозонный аспорогенный мутант);

- стабильность - сохраняет свойства при хранении, культивировании на питательных средах и в результате пассажей через

организм лабораторных животных.

Морфологические признаки:  
грамположительные, не образующие спор  
палочки, капсулы не имеют.

Культуральные признаки: на твердых  
питательных средах клетки штамма образуют  
колонии с гладкой поверхностью и ровным  
краем (в S-форме). При выращивании в  
жидких питательных средах - равномерное  
помутнение.

Резистентность к антибиотикам: растет на  
питательных средах в присутствии  
эритромицина в концентрации 1 мкг/мл и  
линкамицина - 15 мкг/мл.

Биохимическая активность штамма и  
другие свойства: обладает низкой  
протеолитической и гемолитической  
активностью, не сорбирует конго красный, не  
синтезирует и не экскретирует в среду  
культтивирования желтый пигмент.  
Синтезирует белки S-слоя. Оптимальная  
температура роста -37°C, оптимум pH - 7,2.

Питательные потребности: является  
ауксотрофом, зависим в росте от метионина,  
треонина, фенилаланина и тиамина.

Плазмидный состав: не содержит в составе  
генома плазмид *B. anthracis* (pXO1, pXO2).

Пример 1 - определение способности к  
спорообразованию.

Колонии с посевов, инкубировавшихся при  
температуре 37°C в течение 5-ти суток на  
агаре Хоттингера, суспензируют в  
физиологическом растворе. В качестве  
контроля используют спорообразующий  
штамм *B. anthracis* Sterne 34F2. Пробирки с  
культурой помещают в водяную баню и  
прогревают при температуре 65°C в течение  
30 мин или при 80°C - 10 мин. Наличие роста  
до прогрева и отсутствие роста после  
прогрева при высеивании по 0,1 мл культуры на  
агар Хоттингера свидетельствует о  
неспособности клеток сибиреязвенного  
микоба к образованию полноценных спор.

Дополнительно способность к  
образованию спор проверяют при  
микроскопическом исследовании мазков,  
окрашенных фуксином Циля. В качестве  
контроля используют спорообразующий  
штамм *B. anthracis* Sterne 34F2. В опытном  
мазке отмечается отсутствие характерно  
окрашенных спор.

Пример 2 - определение стабильности  
свойства аспорогенности.

Штамм несколько раз (не менее 3-х)  
пассируют на питательной среде (L-агар) при  
температуре 37°C. После последнего пассажа  
делают высеиванием на L-агар и проверяют  
способность к спорообразованию у 20  
изолированных клонов. Отсутствие  
спорообразования у всех тестированных  
клонов свидетельствует о стабильности  
признака. После 3-х пассажей на питательной  
среде проводят 3 пассажа через организм  
лабораторных животных. Для этого белой  
мыши вводят подкожно 0,2 мл клеточной  
сuspензии штамма в концентрации 10 млн.  
спор. У павшей особи делают высеиванием из  
головного мозга и выделяют чистую культуру  
*B. anthracis*. Выделенной чистой культурой  
возбудителя сибирской язвы в той же  
концентрации проводят заражение следующей

мыши и так повторяют всего 3 раза. Затем  
проверяют признак спорообразования по  
изложенной выше схеме. Отсутствие  
способности к образованию спор  
свидетельствует о стабильности признака.

Пример 3 - определение протеолитической  
активности.

Субстратами для определения активности  
протеолитических ферментов являются казеин  
и бычий сывороточный альбумин.

Казеиновая среда для определения  
протеолитической активности содержит (г/л):  
бакто-агар - 15,0, казеин - 2,0, трип - 1,21,  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,5, MnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O - 0,05, MgSO<sub>4</sub> -  
0,2, CaCl<sub>2</sub> - 0,08, ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O - 0,005,  
CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O - 0,005, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 2,0.

Изолированные колонии с помощью петли  
nanoсят бляшкой на поверхность казеиновой  
среды и выращивают в термостате при 37°C  
и течение 24 часов. На каждую чашку nanoсят  
не более 16 колоний. На мутном фоне среды  
вокруг колоний штамма с высокой активностью  
протеолитических ферментов образуются  
зоны просветления шириной до 10 мм. Зоны  
просветления у штамма с низкой активностью  
протеолитических ферментов до 1 мм.

Альбуминовая среда для определения  
протеолитической активности - состав, способ  
приготовления и применения среды указан в  
"Методическом пособии по генетике  
возбудителя сибирской язвы" - Саратов, 1991,  
с.28 - 30 (утверждено заместителем  
начальника главного эпидемического  
управления Минздрава СССР Онищенко Г.).

Пример 4 - определение продукции белков  
S-слоя.

Определение продукции белков S-слоя  
проводят с помощью белкового анализа. Для  
этого 1 петлю штамма *B. anthracis* KM90  
засевают в жидкую питательную среду (BHI) и  
выращивают с аэрацией при 37°C в течение  
16 часов. Затем 20 мл культуры  
центрифугируют при 100000 об/мин, 4°C, 30  
мин. Отбирают супернатант, стерилизуют  
фильтрованием через мембранные фильтры с  
диаметром пор 22 мкм (Millipore) и добавляют  
трихлоруксусную кислоту до конечной  
концентрации 10%. Белок осаждают  
центрифугированием при 100000 об/мин, 4°C,  
30 мин. Препарат ресусцидируют в 50 мкл 0,1  
M трип-НСl буферного раствора (pH - 6,7),  
содержащего 10% глицерина. После чего  
образцы вносят в лунки 7,5%  
полиакриламидного геля. Электрофорез  
проводят при силе тока 90 мА в течение 5 ч.  
Белок S-слоя имеет молекулярную массу 94  
кДА.

Таким образом получен стабильный  
аспорогенный штамм *B. anthracis* KM90,  
обладающий низкой активностью  
протеолитических ферментов, который  
рекомендуется в качестве основы для  
конструирования продуцентов  
сибиреязвенных антигенов и других  
биологически активных веществ - компонентов  
химических вакцин и диагностических  
препаратов.

#### Формула изобретения:

Штамм *Bacillus anthracis* KM90 - основа  
для генетического конструирования  
продуцентов сибиреязвенных антигенов.